

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-201987

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)9月3日

C 12 N 15/14
C 07 K 13/008619-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全23頁)

⑭ 発明の名称 ヒト血清アルブミン断片

⑯ 特 願 平1-344701

⑰ 出 願 平1(1989)12月29日

⑱ 発 明 者 柳 田 光 昭 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社
社総合研究所内

⑲ 発 明 者 榎 昇 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社
社総合研究所内

⑳ 発 明 者 鈴木 正 則 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社
社総合研究所内

㉑ 出 願 人 東 燃 株 式 会 社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ヒト血清アルブミン断片

2. 特許請求の範囲

1. ヒト血清アルブミンのC末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。
2. ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有する請求項1に記載の断片。
3. ヒト血清アルブミンのC末端部分の欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。
4. ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドと、ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列とから成る請求項3に記載の融合蛋白質。
5. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片。
6. ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列を有す

る請求項5に記載のヒト血清アルブミン断片。

7. ヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質。

8. ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドとヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列とから成る請求項7に記載の融合蛋白質。

9. 請求項1、5に記載の蛋白質断片又は請求項3、7に記載の融合蛋白質をコードするDNA配列。

10. 請求項9に記載のDNA配列を含有するプラスミド。

11. 前記DNA配列の上流に、該DNA配列を宿主内で効率よく発現せしめるための制御配列を含有する発現プラスミドである、請求項10に記載のプラスミド。

12. 請求項11に記載のプラスミドにより形質転換された宿主。

13. 請求項12に記載の宿主を培養してヒト血清

アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン蛋白質断片を切り出すことを特徴とする、ヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はヒト血清アルブミンの部分から成る蛋白質断片に関する。この蛋白質断片は薬物等の運搬・供給系のキャリアー等としての用途が期待される。

(従来技術)

ヒト血清アルブミンはヒト肝臓で合成される分子量66,458の高分子血漿蛋白質で、生体内では主に血液の浸透圧調節、種々の物質(例えば脂肪酸、 Cu^{2+} ・ Ni^{2+} などの金属イオン、胆汁ビリルビン、多くの薬物、一部の水溶性ビタミン、など)と結合してそれらの標的臓器への運搬、組織へのアミ

ノ酸供給源、などの重要な役割を果たしている。これらの作用を基礎にして火傷や腎炎などによるアルブミンの喪失や肝硬変などによるアルブミン合成の低下で起こる低アルブミン血症や出血性ショックなどの治療にヒト血清アルブミンは大量に使用されている。血清アルブミンはまた、多くの薬物と非特異的に結合し、それらの血中運搬の役割を果たしている。アルブミンと結合した薬物は血液循環によって体内を動き、やがてアルブミンと遊離して毛細血管壁を通過して拡散し、作用部位へと到達すると考えられている。アルブミンは毒性が少ない、抗原性が低い、生体内で簡単に分解される、薬物との共有結合及び複合体形成が簡単にできる、等のドラッグデリバリーのための担体(ドラッグキャリアー)として優れた特徴を有しており、また各種薬剤の結合サイトも決定または推定されているものが多く、製剤化のためのデザインが簡単にできるという利点も有している。

基本的にはヒト血清アルブミンの断片でも推定されている多くの薬剤に対する結合部位はほとん

ど含んでおり、ドラッグキャリアーとしての活性を示すことができると考えられる。薬物等の運搬・供給系におけるキャリアー等として使用する場合には、薬物等との結合性を限定する等の見地から、むしろヒト血清アルブミン分子全体を使用するよりもその断片を使用する方が有利であると予想される。

一般に、蛋白質を切断してその断片を調製する方法として、蛋白質を臭化シアンのごとき化学物質又はトリブシン、ペプシン等のプロテアーゼを用いる方法が知られている。しかしながら、これらの方法においては、蛋白質のアミノ酸配列に依存して切断部位が必然的に定まるため、任意の部位で切断することができず、従って理想的な蛋白質断片を得ることはできない。従って、ヒト血清アルブミンについてもその様な断片は得られていない。

(発明が解決しようとする課題)

これに対して、組換えDNA技術を用いれば、

任意の部分からなるヒト血清アルブミン断片を適当な宿主細胞中で合成させることができる。従って本発明は、ヒト血清アルブミンの所望の蛋白質断片をコードするDNAを作製し、これに基づく組換えDNA技術により、ヒト血清アルブミンの蛋白質断片及びその製造手段を提供しようとするものである。

さらに詳しくは、本発明は、ヒト血清アルブミンのC-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質、並びにヒト血清アルブミンのN-末端部分が欠失したヒト血清アルブミン断片、及び該断片と他のポリペプチドとから成る融合蛋白質；これらの蛋白質断片又は融合蛋白質をコードするDNA；該DNAを含有するプラスミド；該プラスミドにより形質転換された宿主；及び前記宿主を培養してヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含む融合蛋白質を発現せしめ、融合蛋白質を発現せしめた場合には所望により該融合蛋白質から該ヒト血清アルブミン断片を宿主細胞内又は

試験管内で切り出すことを特徴とするヒト血清アルブミン蛋白質断片又は該断片を含有する融合蛋白質の製造方法に関する。

〔具体的な説明〕

正常ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAはすでにクローン化されている（特願昭63-037453）。従って、このcDNAを用いて、遺伝子工学的手法により正常ヒト血清アルブミンAの任意の断片を製造することができる。

本発明は、この様な断片として、（1）ヒト血清アルブミンのC-末端を欠失した血清アルブミン断片、及び（2）ヒト血清アルブミンのN-末端を欠失した血清アルブミン断片を提供する。本発明は例えば、C-末端が欠失したアルブミン断片の例として正常ヒト血清アルブミンの1位のアスパラギン酸から303位のプロリンまでのアミノ酸配列を有するアルブミン断片（これをミニHSAと称する場合がある）について記載し、そしてN-末端が欠失したアルブミン断片の例として正

常ヒト血清アルブミンの123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片（これを短縮HSAと称する場合がある）について記載する。

これら本発明の2つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ下記のごとき特徴を有している。

本発明のアルブミン断片は、いずれもヒト血清アルブミンの中央部分を含有している。この様に、中央部分を含めたのは、ヒト血清アルブミン分子上の薬剤結合位置は現在までに4つ（サイトI～IV）知られており（Sjöholm, I., Ekman, B. E., Kober, A., Ljungstedt-Pahlman, I., Selving, B. & Sjödin, T. *Mol. Pharmacol.* **16**, 767- (1979)）、これらのサイトにおいて薬物の結合に重要な役割を果たすアミノ酸残基もいくつか知られている（Fehske, K. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 688- (1981)）が、そのほとんどがこの中央部分に集中しているためである。

Sjöholmらは薬物をヒト血清アルブミンに均一に分散させた小球体を使い、多種の薬物の結合位置を調べ、ジアゼパムサイト（サイトI）、ジギ

トキシシンサイト（サイトII）、及びワルファリンサイト（サイトIII）に分類しているが、この他にタモキシフェン（サイトIV）またはビリルビン結合サイトが存在するらしい。Fehskeらはジアゼパムサイト、ワルファリンサイト、ビリルビン結合サイトにおいて重要な役割をしているアミノ酸として各々Lys195とHis146及びArg145, Trp214及びLys199, Lys240を推定している。一方バルミチン酸塩のような長鎖脂肪酸の結合サイトはC端側領域にあるらしく（Reed, R. G., Feldhoff, R. C., Clute, O. L. & Peters, T. *Tr. Biochemistry*, **14**, 4578- (1975); Berde, C. B., Hudson, B. S., Simoni, R. D. & Sklar, L. A. *J. Biol. Chem.* **254**, 391- (1979)）、本発明のC-末端を欠失したヒト血清アルブミン断片を利用すれば長鎖脂肪酸が結合できず、ジアゼパム、ワルファリン等が結合できるドラッグキャリアーの作製が可能となる。

ヒト血清アルブミンは585個のアミノ酸から成る高分子蛋白質で、しかも分子内に35個のシステイン残基を有し、そのうち最もN端側に位置する

システイン残基(Cys-34)のみが遊離のSH基を有する状態で存在し、その他のものは互いにジスルフィド(S-S)結合を形成し、計17個のS-S橋が分子内に形成されている。蛋白質分子の高次（立体）構造形成の過程で少なくとも2種の酵素〔ペプチジルプロリル cis-trans イソメラーゼ及びプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)〕が関与していることが最近明らかになってきたが、S-S橋形成に重要な役割を果たすのは後者のPDIである。血清アルブミンを産生する哺乳類の細胞内では生合成及び血清アルブミン蛋白質の細胞内輸送の過程でPDIが働き蛋白質分子内にS-S橋が形成され、PDIの主な存在場所は小胞体を含むミクロソーム画分であることが知られている。大腸菌をはじめとする原核生物細胞内でヒト血清アルブミンを生合成させた場合には上述のような反応が起き、分子内に正しいS-S橋が形成される保証はなく、Cys-34が分子内のシステイン残基とチオール/ジスルフィド交換反応を起こし、S-S橋のかけ違えが生じ、異性

体を生じる可能性がある。このように遊離のSH基を有するシステイン残基が存在すると本来あるべき正常な立体構造をとった蛋白質ができる効率が低くなり、異常な立体構造をとった蛋白質は機能的にも正常でなくなる危険性が大となる。これに対して、本発明のN-末端部分が欠失した、123位のメチオニンから585位のロイシンまでのアミノ酸配列から成るアルブミン断片では、Cys34が他の6個のアミノ末端側に位置するシステインと共に除かれており、このような危険性を少なくしてある。

本発明においては、前記2つのタイプのアルブミン断片の代表例として特定のアミノ配列範囲を有する2種類のアルブミン断片を具体的に記載するが、2つのタイプのアルブミン断片はそれぞれ前記のごとき特徴を有しており、それらの特徴を発揮することができるアルブミン断片はすべて本発明の範囲に属する。例えば、薬剤結合部位が集中している中央部分として第123位のメチオニンから303位のプロリンまでの範囲を例示したが、

中央部分は必ずしもこの範囲に限定されず、薬剤結合部位の大部分を含む範囲であれば、第123位～303位よりも長くても、短かくてもよい。また、長鎖脂肪酸の結合部位が存在し、従って除去されるべきC-末端側領域として304位からC-末端までの範囲を例示したが、これに限らず、長鎖脂肪酸の結合部位を含む範囲であれば、さらに長い範囲でもよく、又短い範囲でもよい。さらに、システインを多数含有し、従って除去されるべきN-末端の範囲としてN-末端から122位までの範囲を例示したが、第34位のシステインを含有するN-末端側領域であればN-末端から122位までの範囲に限定されるものではなく、さらに長い又は短い範囲であってもよい。

従って、次の条件を考慮しながら種々のアルブミン断片をデザインすることができ、それらは本発明の範囲に属する。ヒト血清アルブミンの断片をデザインするために重要な条件として、特定の薬物結合に必要な立体構造を保持することが期待できるような断片を選定することが重要である。

この際注意すべきことは(i)天然のヒト血清アルブミンの構造中に存在するS-S橋をそのままの形で保持させること、(ii)そのため断片を構成するポリペプチド鎖中には偶数個のシステイン残基を有すること、(iii)S-S橋で結ばれてループを形成しているポリペプチド鎖の途中に切断を入れないこと、即ち天然ヒト血清アルブミン分子中にいくつか存在する主要なドメイン構造あるいは少なくともサブドメイン構造は破壊しないこと、などがあげられる。

1. 遺伝子系

宿主

正常ヒト血清アルブミンは分子内に多くのジスルフィド結合を含有しており、組換えDNA法によって天然物と同じ立体構造を有する正常ヒト血清アルブミン又は断片を製造するには、これらのジスルフィド結合が生産宿主細胞中で正しく形成されることが必須である。正常な立体構造の形成にはプロテインジスルフィドイソメラーゼ、ペプチジルプロリン cis-trans イソメラーゼ等の酵

素が関与していることが最近明らかになり、多数のS-S結合を有し複雑な立体構造をとる蛋白質を殆ど含まない大腸菌や枯草菌のような原核生物細胞ではたとえあってもこのような立体構造形成(フォールディング)関連酵素系の働きは強いことが予想される。一方、ヒトをはじめとする真核高等生物の細胞は数多くの複雑な高次構造を有する蛋白質(糖蛋白質や他の修飾蛋白質も含む)を細胞外に分泌することが知られているが、下等真核微生物である酵母菌でも、哺乳動物の細胞で蛋白質が分泌されるのと非常によく似た経路により蛋白質が分泌されることが知られている(Huf-faker, T.C. and Robbins, P.W. J. Biol. Chem. 257, 3203-3210(1982); Snider, M.D. in Ginsburg, V. & Robbins, P.W. (eds.) Biology of Carbohydrates, Vol. 2, Wiley, New York, (1984), pp. 163-198)。このため異種生物由来(特に哺乳動物)の遺伝子(主としてcDNA)を酵母菌内で発現させ遺伝子産物である蛋白質を、細胞外に分泌せしめようとする実験が最近多く試みられてきた。たとえばヒト

インターフェロン α_1 , α_2 , γ [Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L., Goeddel, D.V. Science 219, 620-625 (1983)]、
 仔ウシプロキモシン [Smith, R.A., Duncan, M.J., Moir, D.T. Science 229, 1219-1224 (1985)]、ヒト
 上皮成長因子 [Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiaz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 4642-4646 (1984)]、
 マウスインターロイキン2 [Miyajima, A., Bond, M. W., Otsu, K., Arai, K., Arai, N. Gene 37, 155-161 (1985)]、ヒト β -エンドルフィン [Bitter, G. A., Chen, K.K., Banks, A.R., Lai, P.-H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 5530-5534 (1984)]などで酵母菌による細胞外分泌が報告されているが、その分泌効率はマウスインターロイキン2の約80%からヒトインターフェロンの4~10%まで目的とする蛋白質によりかなりの差がある。又、これらのうちその蛋白質自身のシグナルペプチドを用いて細胞内輸送を試み、そのシグナルペプチドがうまく

く切断されて分泌することに成功しているのはヒトインターフェロンである。その他のものは酵母インベルターゼ(SUC2)のシグナルペプチドや接合因子 $\alpha 1$ (MF $\alpha 1$)のリーダー配列など酵母の蛋白質の細胞内輸送に必要なシグナル配列を目的とする成熟蛋白質に直接融合した形で発現させ、細胞内輸送を行わせたものである。さらに正しい位置でプロセッシングを受けていることが明らかなのは少なく、ヒトインターフェロンの場合は約半分以上が正しいプロセッシングを受けているが、ヒト β -エンドルフィンではペプチド内部でも切断を受けている。

酵母菌を宿主として用いる遺伝子工学的物質生産性の特徴としては以下のようなものがある。

1. 大量高密度培養による発酵生産が容易かつ経済的である。また動植物の培養細胞系と比較して厳密に管理制御された培養装置を特別必要としない。
2. 発酵生産に多くの経験が蓄積されている。
3. 分子遺伝学的な知識が急速に蓄積されつつ

ある。

4. 外来性の遺伝物質を細胞内及びゲノム内に取り込ませることが容易である。

5. 蛋白質の細胞内輸送及び、細胞外分泌の遺伝学及び生理学に対する理解が急速に高まっている。

6. 適切なプラスミドベクターを選択すれば、外来性の遺伝子をエピソード状態(YEp系プラスミド使用)、ゲノムに組み込ませた状態(YIpプラスミド使用)、酵母のセントロメアを含み細胞分裂に伴い染色体DNAとともに複製できる状態(YCpプラスミド使用)、及び酵母の自律複製配列(ARS)を含み自律的に複製できる状態(YRpプラスミド使用)の4種の状態におくことができる。

7. シグナルペプチドやプロ配列などの細胞内プロセッシング機能がある。

8. 酵母菌で合成される糖蛋白質に見い出される糖鎖は高等動植物の糖蛋白質における複合型糖鎖とは異なる高マンノース型糖鎖ではあるが、酵

母菌の小胞体で起こるコア糖鎖の付加は高等動物と共通した過程であり、両者における相違は外側の糖鎖の付加に見られるのみである。

9. ビタミン、微量因子等の添加により完全合成培地で形質転換体を生育させることができる。

10. 純粋なグルコースでなく粗製の糖源を利用してしても形質転換体を生育させることができる。

この様な背景に基づいて、本発明においては酵母を宿主として使用する。

(ブレプロ配列)

ヒト血清アルブミン断片を酵母細胞中で発現せしめ、これを効率よく分泌せしめるためには、N-末端にブレプロ配列が存在する必要がある。また、このブレプロ配列は目的蛋白質の分泌の際に切除されて該目的蛋白質が成熟型で分泌される必要がある。このため本発明においては、この様な条件を満たすブレプロ配列としてヒト血清アルブミンの本来のブレプロ配列を使用する。

酵母における蛋白質の発現を増強するためには該蛋白質のN-末端領域をコードするコドンとし

て、酵母中で効率よく翻訳されるコドンを使用するのが好ましい。このため、本発明においては、前記ブレプロ配列をコードするDNA配列として、酵母において効率よく発現される遺伝子において高頻度で使用するコドンから構成される合成DNA配列を使用する。この様なコドンとして例えば次のコドンを用いる。

Lys=AAG Trp=TCG Val=GTT Thr=ACT
Phe=TTT Ile=ATC Ser=TCT Leu=TTG
Ala=GCT Tyr=TAC Arg=AGA Gly=GGT

ブレプロ配列をコードするDNA部分の一例として次の配列を用いることができる。

AA TTC ATG AAG TGG GTT ACT TTC ATC TCT TTG
G TAC TTC ACC CAA TGA AAG TAG AGA AAC
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu

EcoR I

TTG TTC TTG TTC TCT TCT GCT TAC TCT AGA
AAC AAG AAC AAG AGA AGA CGA ATG AGA TCT
Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg

GGT GTT TTC AGA CG
CCA CAA AAG TCT GCG C
Gly Val Phe Arg Arg

上記の配列のN-末端のMetのコドンの上流にはEcoR I 粘着末端が設けられており、この制限

酵素部位により上記配列はベクターに挿入される。また、上記ブレプロ配列のC-末端のArgのコドンとしては、酵母での翻訳のために好ましいとして上記したコドンではなく、CGCが採用されており、これにより5'-末端をCla Iにより切断したヒト血清アルブミン断片と連結することができる。

ヒト血清アルブミン断片遺伝子

ヒト血清アルブミンAをコードする遺伝子(cDNA)はすでにクローン化されており、その塩基配列及び該塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、特願昭63-037453に詳細に記載されている。従って本発明においては、このcDNAを含有するプラスミドpUC-HSA・CH等をヒト血清アルブミン断片をコードする遺伝子の供給源として使用することができる。なお、これらのプラスミドの作製方法を参考例として後記する。

ポリA配列及びAATAAAシグナル

コード配列の3'-末端の下流に存在するポリA配列及びAATAAAシグナルが真核生物のmRNAの安

定性に寄与すると言われている〔Bergmann及びBrawerman Biochemistry, 16, 259-264(1977); Huezら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, 908-911(1981)〕。従って、本発明の好ましい態様においては、ヒト血清アルブミンAをコードするcDNAの下流にこれらの配列を配置する。ポリA配列及びAATAAAシグナルとしては、例えばヒト血清アルブミンA cDNAに自然に付随しているこれらの配列を使用することができる。これらの配列を含有するヒト血清アルブミンA遺伝子はすでにクローン化されており、特願昭63-037453に記載されている。これらの配列の供給源として例えばλgt11(HSA-I A)を使用することができ、その作製方法を参考例において後記する。

プロモーター

本発明においては、酵母細胞中で機能するものであればいずれのプロモーターを使用することもできる。しかしながら本発明においては誘導可能なプロモーターではなく構成的プロモーターを使用するのが好ましい。誘導可能なプロモーターを

使用して誘導操作を行った場合にはヒト血清アルブミンが細胞内に急激に蓄積し、分子間ジスルフィド結合が形成されて非天然型の立体構造を有する分子が生成する可能性があるからである。

弱い誘発性を示すか又は構成性の酵母プロモーターの内、強力な活性を持つものとしては、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH I) プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAP) プロモーター、及びグリセリン酸リン酸キナーゼ(PGK) プロモーターがあり、本発明においては、ADH I プロモーターを例にとって具体的に説明する。

酵母 ADH I 遺伝子(ADC 1) を含む約2,100 塩基対の領域の塩基配列が既に決定されており、ADH I をコードする約1,100 塩基対の配列の他に 750 塩基対の5' 側非翻訳配列と 320塩基対の3' 側非翻訳配列が判明している〔Bennetzen, J および Hall, B. J. Biol. Chem. 257, 3018-3025(1982)〕。転写においてRNAポリメラーゼによる認識配列と考えられているGoldberg-Hognessボックス(TATA

ボックス)は翻訳開始コドンATGの128塩基上流(-128の位置)にあり、ADH Iプロモーター活性は-410の位置にあるSph I認識部位より上流を欠失させても失われまいといわれている(Beier及びYoung, Nature 300, 724-728(1982))。ADH Iプロモーターによる転写物は通常の酵母菌で全ポリ(A)RNAの少なくとも1%に達する(Anmerer, G. Methods Enzymol. 101, 192-201(1983))。

ターミネーター

転写における読み越し(read-through)により遺伝子生成物の量が減少する例が報告されている(例えば、Zaret, K.S. 及びSherman, F., Cell 28, 563-573, (1982))。この現象を防止するためには発現されるべき構造遺伝子の下流にターミネーターを設けるのが好ましい。酵母ターミネーターを外来遺伝子の下流に配置し、遺伝子の発現を上昇させた例としてはたとえばPGKプロモーター/ターミネーターからなるサンドイッチベクターを用いて子牛キモシンを発現させた実験があり、

ターミネーターの導入により数倍〜十倍程度の発現上昇が報告されている(Hellorら Gene 24, 1-14(1983))。このような目的のためのターミネーターとしてはさまざまな遺伝子由来のものが使用でき、たとえばTRP5(トリプトファン合成酵素)遺伝子やCYC1(イソ-1-チトクロームC)遺伝子などのターミネーターが利用されている。強力なプロモーターが関与する転写の場合、リードスルーを防ぐために強力なターミネーターがその下流に配置されている方が発現の制御に好都合と考えられる。このため本発明においては例えば強力なプロモーターを有する遺伝子のターミネーターであるADH Iターミネーター、CAPターミネーター等を用いるのが好ましい。

ベクター要素

以上、本発明の発現プラスミド中に含有される、発現に直接関連する要素について説明したが、本発明の発現プラスミドは、さらに、酵母複製起点及び標識遺伝子を含有しなければならない。酵母複製起点としては、例えば酵母由来の2 μ プラス

ミドDNAの複製起点等を使用することができる。標識遺伝子としては、宿主に薬剤耐性を付与する遺伝子、宿主の栄養要求性を補完する遺伝子等、常用の標識遺伝子を用いることができる。さらに、プラスミドの組換え操作の際にプラスミドの複製を大腸菌中で行わせる必要があるため、本発明のプラスミドは大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含有するシャトルベクターであることが好ましい。この様な、シャトルベクターとしての基本的要件を備えたベクターとして市販のプラスミドpJDB207等を用いることができる。このプラスミドpJDB207中の酵母標識遺伝子は、ロイシン生合成酵素である β -イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素をコードするLEU2遺伝子である。

発現プラスミド

従って本発明の好ましい発現プラスミドにおいては、酵母複製起点及び標識遺伝子並びに大腸菌複製起点及び標識遺伝子を含んでなるシャトルベクターに、プロモーター、プレプロ配列をコードするリーダー配列が連結されたヒト血清アルブミ

ン断片をコードする遺伝子、ポリA配列及びターミネーターがこの順序で挿入されている。

2. 形質転換

本発明のプラスミドによる宿主酵母の形質転換は常法に従って行うことができ、その具体例を実施例9に記載する。

3. 酵母の培養及びヒト血清アルブミン断片の回収

ヒト血清アルブミン断片cDNAを含んだ発現プラスミドにより形質転換された宿主酵母菌は通常の酵母の培養法により培養できる。たとえばYPDのような天然完全培地やSD培地に1%の酵母エキスを加えたような不完全合成培地でも培養できる。

培養後細胞外に分泌されたヒト血清アルブミン断片の回収は種々の方法で可能である。エタノール、アセトン、硫酸アンモニウムなどによる分別沈殿、等電点沈殿、限外ろ過などによる濃縮及び部分精製を行った後に各種クロマトグラフィーや上記部分精製法を組み合わせれば高度に分泌ヒト

血清アルブミン断片が精製されることが期待できる。

正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAの作製方法は参考例1において具体的に記載する。目的とする蛋白質断片をコードするDNAは、その全体を常法に従って化学合成することもでき、又前記のcDNAから調製することもできる。cDNAから調製する場合、正常ヒト血清アルブミンAの全体又は大部分をコードするcDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端の内側で、適切な制限エンドヌクレアーゼにより切断し、不足の末端コード配列を化学合成したDNAにより補完することにより調製される。あるいは、cDNAを、目的とする蛋白質断片をコードするcDNA領域の5'末端又は3'末端外側で、適切な制限エンドヌクレアーゼにより切断した後、余分のDNA部分をエキソヌクレアーゼにより除去することもできる。上記2つの方法の内5'末端と3'末端の加工において異なる方法を組み合わせることもできる。

願分に記載)から短縮型ヒト血清アルブミン(Het 123 ~Leu585)をコードする部分を各々得て、これらを適当な方法で連結すれば完成する。

本発明の正常ヒト血清アルブミン断片をコードするDNAは、それ自体として発現させることもできるが、他のペプチドをコードするDNAと連結した状態で発現せしめ、融合蛋白質を得ることができる。この様な融合蛋白質を得る場合の融合パートナーとして種々のペプチドを用いることができ、その1つとして例えばヒト血清アルブミンのリーダー配列が挙げられる。目的とするヒト血清アルブミン断片をこの様な融合蛋白質として得る場合には、その後、細胞内または試験管内でリーダー配列を除去してヒト血清アルブミン断片を得ることができる。

ヒト血清アルブミン断片の発現のためには、例えば前記のごとき融合蛋白質をコードするDNAを適当な発現ベクター、例えばプラスミドに挿入した後、該ベクターを宿主に導入する。発現用宿主としては動物細胞や酵母のごとき真核細胞、及

本発明の例においては、ヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドとミニHSAの融合蛋白質をコードするDNAとしては既に特願昭63-268302に記載のヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチドと全長の成熟ヒト血清アルブミン分子との融合蛋白質をコードするDNAを含むプラスミドpUC-HSA-ERからヒト血清アルブミンのシグナルペプチド及びプロペプチド及びヒト血清アルブミンAのAsp1~Pro152までをコードするDNAを特願昭63-268302に記載のプラスミドpUC-HSA-Iから切り出したGlu153~Pro303をコードするDNA断片とを融合したものを使用する。短縮HSAをコードするDNAとしてはヒト血清アルブミンのカルボキシル末端側をコードする部分を欠くcDNAクローンHSA-II(S63 2/22出願分に記載)からヒト血清アルブミンのプレプロ配列を、大腸菌アルカリホスファターゼのシグナルペプチド及び短縮型ヒト血清アルブミンの融合蛋白質をコードするDNA配列を含むpAT-trp-phoA-tHSA(H1. 8/25出

び細菌のごとき原核細胞を用いることができ、ベクターは宿主に依存して選択される。

〔発明の効果〕

本発明のC-末端領域を欠失したアルブミン断片は、C-末端に存在する長鎖脂肪酸の結合部位を欠いているため、長鎖脂肪酸を結合せず、しかも中央領域により種々の薬物と結合することができるという特徴を有する。他方、N-末端領域を欠失したアルブミン断片はCys34及び他の多数のシステイン残基を欠いており、蛋白質の安定なフォールディングのために有利である。

次に、本発明のヒト血清アルブミン断片の製造について、実施例により具体的に説明する。

なお、実施例中に特に記載しない場合、DNAの処理のための酵素反応は次の条件によった。

実験方法

酵素反応

各酵素反応は次の条件で行った。制限酵素EcoRI(ニッポンジーン;20ユニット/μl)、HindIII

(宝酒造; 10ユニット/ μ l)、BamHI (宝酒造; 12ユニット/ μ l)、XhoI (宝酒造; 12ユニット/ μ l) によるDNAの消化: DNA 2 μ g、酵素1 μ l 及び10×EcoRI緩衝液 (1M Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl₂、500mM NaCl) 2 μ lに滅菌蒸留水を加えて20 μ lとする。37℃で1時間反応させて切断する。BstEII (ニッポンジーン; 7.5ユニット/ μ l)、PstI (ニッポンジーン; 20ユニット/ μ l) の場合は10×EcoRI緩衝液の代わりに100mM Tris-HCl (pH8.0)、70mM MgCl₂、1.5M NaClを使用し、BstEIIは60℃で、PstIは37℃でそれぞれ1時間保温して反応させる。SmaI (ニッポンジーン; 10ユニット/ μ l) の場合は10×EcoRI緩衝液の代わりに100mM Tris-HCl (pH8.0)、70mM MgCl₂、200mM KCl 4 μ lを使用し、37℃でそれぞれ1時間保温して反応させる。T4リガーゼ処理は次の条件で行った。ベクターDNA 1 μ g、ベクターDNAと等モル量のDNAフラグメント、10×リガーゼ緩衝液 (660mM Tris-HCl (pH7.5)、66mM MgCl₂、100mM ジチオスライトール、1mM

ATP) 2 μ l及びT4 DNAリガーゼ 1 μ l (宝酒造; 約400ユニット/ μ l) に滅菌蒸留水を加えて20 μ lとし、16℃で一晩保温する。

実施例1. 酵母菌でのミニHSA発現プラスミドの構築

ミニHSA発現プラスミドの構築は次のように行った。まず pUC-HSA-EH (参考例3) から EcoRI-HpaII で切り出した天然型HSAアレプロ配列とAspI-Pro152をコードするフラグメント、及び pUC-HSA-I (参考例5) から HpaII-PstI により切り出したGlu153-Pro303をコードするフラグメントを、プラスミドpUC19のEcoRI-PstI部位に挿入してプラスミド pUC-mHSA-EHを作製した。この pUC-mHSA-EHをアレプロHSA cDNA配列の5'端にあるEcoRI部位で切断し、ここに両末端がEcoRI粘着末端配列で内部にXhoI部位をもつ合成リンカーを挿入してプラスミド pUC-mHSAを作製した。この pUC-mHSAから XhoI-HindIII で切り出したフラグメント、及び pUC-nHSAからHindIII-BamHIで切り出したアレプロ

HSA cDNAの3'側配列でポリAシグナル及びポリA配列を含む領域を、プラスミドpUC18XのXhoI-BamHI部位に挿入してプラスミド pUC-mHSA-Aを作製した。なお、ここで用いたプラスミドpUC18Xは、pUC18のEcoRI部位に上記と同様に両末端がEcoRI粘着末端配列で内部にXhoI部位をもつ合成リンカーを挿入して作製したものである。また pUC-nHSAは天然のアレプロHSA cDNA配列を含むプラスミド pAT-nHSA-A (参考例8) を XhoI/BamHI で二重消化して、アレプロHSA cDNA部分を含む断片を得て、これをpUC18XをXhoI/BamHIで二重消化して得た大きな断片と連結して作製したプラスミドである。次に、プラスミドpUC-mHSA-AのアレプロミニHSA翻訳領域、ポリAシグナル、ポリA配列を含むXhoI-BamHIフラグメントを、pJDB-ADH-nHSA-Aプラスミド (このプラスミドを含有する大腸菌*Escherichia coli* HB101/pJDB-ADH-nHSA-Aは工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌第2454号(FERM BP-2454)として1989年6月8日にブタベスト条

約に基づき国際寄託されている。) から XhoI-BamHI により切り出した大きい方のフラグメントと連結し、pJDB-ADH-mHSAプラスミドを作製した。

実施例2. 酵母菌での短縮HSA発現プラスミドの構築

短縮HSA発現プラスミドの構築は以下のように行った。まず、ヒト血清アルブミンのカルボキシル末端側をコードする部分を欠くcDNAクローン HSA- Δ IIをEcoRIで切り、生じたフラグメントをpUC19のEcoRIサイトに挿入しプラスミド pUC-HSA- Δ IIBを得た。プラスミド pUC-HSA- Δ IIBからEcoRI-TaqIによりHSAの5'側非翻訳領域、及び天然型HSAアレプロ配列を含むフラグメントを切り出し、プラスミドpUC18のEcoRI-AccI部位に挿入してプラスミド pUC-Sigを作製した。このプラスミド pUC-Sig からHincIIによりHSAの5'側非翻訳領域、及び天然型HSAアレプロ配列を含むフラグメントを切り出し、プラスミドpSALII (参考例5) のSmaI部位

に挿入してプラスミド pUC-Sig - SAL II を作製した。これにより得られたプラスミド pUC-Sig - SAL II は HSA の 5' 側非翻訳領域、天然型 HSA プレプロ配列及び Met123~Pro 303 をコードするが、プレプロ配列と Met123 の間にアミノ酸で Gly-Ser に対応するコドン GGATCC がアダプター配列として残っている。次に pUC-Sig - SAL II から BstE II - Pst I により切り出したプレプロ配列と Gly-Ser 及び Met123~Pro303 をコードするフラグメントを、前述の pUC-nHSA から BstE II - Pst I により切断して得られる大きい方のフラグメントに連結し、プラスミド pUC-nSAL II を作製した。このプラスミド pUC-nSAL II から BamH I - Hind III により切り出した大きい方のフラグメントに、pAT-trp-phoA-tHSA (このプラスミドを含有する大腸菌 HB101 (pAT-trp-phoA-tHSA) は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第 10951 号 (PEMP P-1051) として寄託されている。) から BamH I - Hind III により切り出した短縮 HSA をコードするフラグメントを挿入し、プ

スミド pUC-nHSA を作製した。このプラスミド pUC-nHSA から Xho I - Hind III により切り出したプレプロ配列と tHSA をコードするフラグメント、及び pUC-nHSA から Hind III - BamH I により切り出したポリ A シグナルを含むフラグメントをプラスミド pUC18X の Xho I - BamH I 部位に挿入し、プラスミド pUC-nHSA - A を作製した。このプラスミド pUC-nHSA - A から Xho I - Sma I により切り出したフラグメントを pJDB-ADH - nHSA - A プラスミドから Xho I - Sma I により切り出した大きい方のフラグメントと連結し、酵母菌での発現プラスミド pJDB-ADH - tHSA を作製した。

実施例 3. 酵母菌の形質転換

HSA 断片発現プラスミド pJDB-ADH - nHSA 及び pJDB-ADH - tHSA による酵母菌の形質転換は、橋本英明、木村光の KUR 法〔発酵と工業、43, 630-637 (1985)〕を改変した方法により行った。まず、YPD 培地〔1% 酵母エキス (Difco)、2% バクトペプトン (Difco)、2% グルコース〕50 ml に AH22 株 (MATa, leu2-3, leu2-112, his4

-519, can1) の YPD 培地による一晚培養液 1 ml を加え、30℃ で 600nm での吸光度が 0.5 に達するまで培養した。これを 4℃ で 2000rpm、5 分間の遠心で集菌し、菌体を 5 ml の 0.1 M LiSCN に懸濁した。次にそのうちの 1.5 ml を分取して 2000 rpm、5 分間の遠心で集菌し、菌体を 10 µl の 2 M LiSCN、46 µl の 50% ポリエチレングリコール 4000 に懸濁し、さらに 10 µl の DNA 溶液 (5-10 µg の DNA を含む) を加えて 30℃ で一晚保温した。この懸濁液に 500 µl の滅菌蒸留水を加えてボルテックスミキサーにてゆるく振とうした後、2000rpm、5 分間遠心して集菌し、菌体を 100 µl の滅菌蒸留水で再懸濁し選択用の寒天培地〔SD 培地: 20 µg/ml ヒスチジン塩酸塩、0.67% アミノ酸非含有イーストニトロゲンベース (Difco)、2% グルコースに 2% の寒天を加えたもの〕にまいた。30℃ で数日培養した後、生じたコロニーについて、実施例 4 に示す方法で HSA 断片の発現を検出することにより各々の HSA 断片を発現するプラスミドを含む AH22 (pJDB-ADH - nHSA) と AH22 (pJDB-

ADH - tHSA) を得た。

実施例 4. HSA 断片の発現

前記の形質転換体 AH22 (pJDB-ADH - nHSA) 及び AH22 (pJDB-ADH - tHSA) を 5 ml の YPD 培地で 30℃ で 24 時間培養した。

細胞外に分泌された HSA 断片の検出は以下のように行った。培養液を 10000rpm、5 分間遠心した後の上清を 800 µl 分取し、エタノール 800 µl を加え水中で 30 分間放置した。これを 12000rpm、5 分間遠心し、得られた沈澱を遠心エバポレーターで乾固させた後 SDS-PAGE 試料用緩衝液〔2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、7% グリセロール、0.00625% ブロムフェノールブルー、0.0625M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8〕20 µl に溶かし、5 分間煮沸した。この試料 10 µl を分離ゲル濃度 4-20% の SDS-ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動〔Laemmli の方法: Nature (London) 277, 680 (1970)〕した後、クマシーブリリアントブルー (CBB) により染色した。

また、同様に行った電気泳動後のゲルについて、

以下に示すようにウェスタンブロッティングを行った。すなわち、SDS-PAGE終了後のゲルをブロッティング装置(TEFCO社、Model:TC808)によりニトロセルロースフィルター(Bio-rad 社、Trans-blott®)にブロッティングした。ブロッティング終了後、フィルターを3%のゼラチンを含むTB S液(20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5M NaCl)で30分間処理した後、TTBS液(0.05%のTween20を含むTB S液)にて5分間の洗浄をTTBS液をかえて2回行った。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗HSA抗体(カッセル社)を1%ゼラチンを含むTTBS液で1000倍に希釈した溶液中にフィルターを移し、1時間処理した。フィルターをTTBS液で2回、TB S液で1回、それぞれ5分間洗浄した後、0.015% H_2O_2 、0.05% HRP-カラーデベロップメントリジェント(Bio-rad 社)、20%メタノールを含むTB S液にフィルターを移して15分間反応させた。反応終了後はフィルターを水で洗浄した。

菌体内に蓄積したHSA断片の検出は以下のよ

うに行った。すなわち、培養液 300 μ l を5000rpm、5分間遠心して集菌し、菌体を30 μ l のSDS-PAGE試料用緩衝液に懸濁し、100℃で10分間煮沸した。この試料10 μ l を上と同じ方法で電気泳動してウェスタンブロッティングを行った。

クマシーブリリアントブルー(CBB)染色の結果を第4図に示す。この図において、レーン1はHSA標準、レーン2及び6は分子量標準、レーン3はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の発現生成物、レーン4は宿主AH22の培養物、そしてレーン5はAH22(pJDB-ADH-lHSA)の発現生成物、についての結果を示す。またウェスタンブロッティングの結果を第5図に示す。この図中、レーン1は宿主AH22の培養物、レーン2はAH22(pJDB-ADH-lHSA)の培養上清、レーン3はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養上清、レーン4はHSA標準、レーン5はAH22(pJDB-ADH-lHSA)の培養細胞内蛋白質、レーン6はAH22(pJDB-ADH-mHSA)の培養細胞内の蛋白質、そしてレーン7は宿主AH22の細胞内蛋白質、についての結果を示す。

図に示すようにミニHSAは菌体外に分泌され、SDS-PAGEで分子量約35000のバンドとして同定された。しかし、短縮HSAは培地中に少量分泌され、菌体内に多量蓄積していた。

実施例5. ミニHSAの精製及び分析

前記の形質転換体AH22(pJDB-ADH-mHSA)を、グルコース5%を含むYPD培地(1%酵母エキス(Difco)、2%バクトペプトン(Difco)、5%グルコース)4 μ l で30℃で40時間培養した。この培養液1500 μ l を0℃に冷却し、これに-20℃のエタノールを1500 μ l を加えた後0℃で30分間攪はんした。12000rpm、15分間の遠心により得られた沈澱を、30 μ l の100mM Tris-HCl 緩衝液pH8.0に溶解した後、100 μ l の10mg/ μ l RNaseA(熱処理済)を加え室温で15分間処理した。これを750mM NaCl、10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.9に対して一晚透析した後、18000rpmで10分間遠心して上清を得た。この上清を高速液体クロマトグラフィーのヒドロキシアパタイトカラム(Tonen Hydroxyapatite TAPS-052110 (ϕ 21×100mm))にかけて、流速

3 μ l/min、60分間の10mM~200mMのリン酸濃度勾配により溶出した。ミニHSAのピークの同定は280nmの吸光度、及びSDS-PAGEにより行った。

得られたミニHSAのピークを水に対して透析した後、凍結乾燥し、さらに3 μ l の500mM NaCl、50mM Tris-HCl pH8.0、0.05% NaN_3 に溶解した。この試料をSephacryl S-200(Pharmacia社、super fine grade(1.6×90cm))のゲル濾過カラムにかけ、試料の溶媒と同じ溶液により、流速8.6 μ l/hrで溶出した。ミニHSAのピークの同定は上と同様に行った。次に、得られたミニHSAのピークを高速液体クロマトグラフィーの逆相カラム(TSK gel, phenyl-5PW RP(4.6×76mm))にかけ、0.1%トリフルオロ酢酸存在下で流速1 μ l/min、60分間の0%~70%のアセトニトリル濃度勾配により溶出した。280nmの吸光度により同定した結果ミニHSAは2つのピークとして検出されこれらのピークを最終精製標品とした。

ミニHSAのN末端アミノ酸配列の同定

精製したミニHSAの試料を凍結乾燥した後、

トリフルオロ酢酸に溶解し、アミノ酸配列自動分析機 (Applied Biosystems社、Protein Sequencer 477A) によりN末端アミノ酸配列を同定した。アミノ酸配列自動分析機により同定された2つのミニHSAのN末端アミノ酸配列はともに以下の通りであった。

Asp-Ala-Hys-Lys-X-Glu-Val-Ala-

この配列は成熟HSAのN末端アミノ酸配列と同一であり、ミニHSAの発現、分泌の際にも天然のHSAと同じプロセッシングが行われていることがわかった。

ミニHSAのC末端のアミノ酸の同定

上で精製したミニHSAの試料 (約1nmol) を加水分解用試験管に入れて凍結乾燥した後、無水ヒドラジン (Ardlich社) 50μlを加えて、減圧下で100℃、5時間反応させた。室温に冷却した後、減圧により過剰のヒドラジンを除去し、さらに減圧デシケーター中で一晩乾燥した。この試料について、アミノ酸自動分析機 (日本電子、JLC-300) を用いてアミノ酸分析を行い、C末端アミノ

酸を同定した。また、上の試料を塩酸加水分解した後アミノ酸分析を同様にを行い、試料を定量してC末端アミノ酸の回収率を求めた。この結果、ミニHSAのC末端アミノ酸は、ヒドラジン分解法により2本の精製ピークともProと同定された。構築されたミニHSAはC末端にProが存在するべきなので、この結果はそれと矛盾しないものである。

ミニHSAのアミノ酸組成分析

上で精製したミニHSAの試料 (約100pmol) を試料用試験管に入れて凍結乾燥した後、PICO-TAG(TM) ワークステーション用反応バイアルに入れた。この反応バイアルに定沸点塩酸 (和光純薬、精密分析用) 500μlを入れて、減圧下、110℃で加水分解した。反応時間は24、48、72時間とした。加水分解終了後、試料用試験管内の塩酸を減圧下で除去し、得られた試料のアミノ酸組成を、アミノ酸自動分析機 (日本電子、JLC-300) を用いて分析した。

この結果を次の表に示す。

ピーク1 (小ピーク)

アミノ酸	実験値	理論値
Ala	35.0	35
Arg	12.8	14
Asx	31.9	31
Cys	ND	19
Glx	45.5	42
Gly	7.8	7
His	11.4	10
Ile	4.9	5
Leu	29.6	32
Lys	28.3	28
Met	3.0	3
Phe	16.9	17
Pro	11.4	12
Ser	10.9	12
Thr	11.7	12
Trp	ND	1
Tyr	7.3	8
Val	14.7	15

ND = 未決定

ピーク2 (大ピーク)

アミノ酸	実験値	理論値
Ala	35.0	35
Arg	13.4	14
Asx	31.7	31
Cys	ND	19
Glx	45.3	42
Gly	7.5	7
His	11.0	10
Ile	5.1	5
Leu	30.0	32
Lys	28.0	28
Met	2.6	3
Phe	17.0	17
Pro	12.0	12
Ser	11.7	12
Thr	11.8	12
Trp	ND	1
Tyr	7.6	8
Val	14.8	15

ND = 未決定

前記の表から明らかなごとく、得られた実験値は理論値とほぼ等しく、また、上に示したN末端アミノ酸配列及びC末端アミノ酸の結果をあわせると、発現分泌されたミニHSAは構築された通りの構造であった。

参考例1. 正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含む
クローンのスクリーニング

正常ヒト血清アルブミンA cDNAを含むクローンのブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングのため米国CLONTECH社の λ gt11をベクターとして作成されたヒト肝cDNAライブラリーを用いた。 λ gt11組換え体ファージを大腸菌Y1090を宿主として感染させ、形質転換ブランク合計 5.5×10^8 個をLB寒天培地(ルリア培地+1.5%寒天)上に形成させ組換えDNAをメンブランフィルター(Amersham社Hybond-N)に移した後、 32 P放射性同位元素で標識した合成オリゴヌクレオチド3種(比活性 $\geq 10^7$ cpm/ μ g)をプローブとして用いスクリーニングした(Benton & Davis Science 196,180-182(1977))。この3種のプロ

ーブは各々Lawnら(Nucleic Acids Res 9, 6103-6114(1981))によって報告されたヒト血清アルブミンcDNAの配列のうち5'非翻訳領域(翻訳開始のATGコドンより12ヌクレオチド上流からATGコドンの前のヌクレオチドまでの部分)と翻訳領域(アミノ末端のメチオニンコドンすなわちATGより9番目のアミノ酸ロイシンをコードする部分)を含むもの(HSA-1)、248番目のグリシンから260番目のロイシンをコードするもの(HSA-2)、並びに576番目のバリンからカルボキシル末端585番目のロイシンをコードする部分とそれに続く6ヌクレオチドから成る3'-非翻訳領域を含むもの(HSA-3)と同じ配列である。このプローブの合成は自動DNAシンセサイザーにより行い、標識は(γ - 32 P)ATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて行った。HSA-2で陽性のシグナルを与えた200個の λ gt11クローンのうち4個のクローンからDNAを調製(BlattnerらScience 202,1279-1284(1978))し、これをEcoRI酵素で消化し、消化物のサザンブロット

をHSA-2プローブとハイブリダイズさせた(Southern, E., J. Mol. Biol. 503-517(1975))。ハイブリダイズしたフラグメントは3つのクローンが得られ各々1.8 kb, 1.4 kb, 1.3 kbの長さであった。このうち1.8 kbと1.3 kbの長さのフラグメントをpUC19ベクターにサブクローニングした。このサブクローンをHSA-1とHSA-3を各々プローブとしてコロニーハイブリダイゼーション(GrunsteinおよびHogness Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965(1975))によりスクリーンした。この結果HSA-3のみにハイブリダイズするクローン λ gt11(HSA I-A)が得られた。このクローンの各種DNA断片を塩基配列決定用ベクターM13mp18およびmp19 RF-DNA上に移し、ダイデオキシヌクレオチドターミネーション法(Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467(1977))により塩基配列を決定した。一方HSA-2をプローブとして行った λ gt11クローンのブランクハイブリダイゼーションにおいて陽性のシグナルを与えたクロー

ンのうち20個についてHSA-1をプローブとして再びブランクハイブリダイゼーションを行い、1個の陽性のシグナルを与えるクローン λ gt11(HSA-II)を得た。これからファージDNAを調製しEcoRI消化物についてHSA-1をプローブとして用いサザンハイブリダイゼーションを行い1.25kbのフラグメント(HSA-II)がプローブとハイブリダイズすることを確認した。このフラグメントの塩基配列をダイデオキシヌクレオチドターミネーション法で決定した。HSA-IIはHSA-3プローブとはハイブリダイズしなかった。この結果HSA-IIはカルボキシル末端側をコードする部分を欠き、HSA-I-Aはヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドン(TCA)が翻訳終止コドンのオパールコドンTGAに変化していることがわかった。この2つのDNAフラグメントの制限酵素地図を第6図に示す。酵素認識サイトの正確な位置は最終的な塩基配列から得た。

参考例2. プラスミド pUC-HSA-CHの作製(第7図)

成熟正常ヒト血清アルブミンAの全体をコードするDNAを含むプラスミド pUC-HSA-CHを次の様にして造成した。

ヒト肝cDNAライブラリーから得たHSA cDNAを含むクローンλgt11(HSA-II)からEcoRIとXbaI消化によって生じるフラグメントを調製し、これをpUC19プラスミドのEcoRIとXbaIとの二重消化物のうち大きな方のフラグメントとT4 DNAリガーゼを用いて結合させ組換えプラスミド pUC-HSA-EXを構築した。

このプラスミドからAhaIIIとSalIの二重消化により生ずる小さい方のフラグメントを精製した。このフラグメントは成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質の12番目のLysから356番目のThrまでをコードする。成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質をアミノ末端からコードする遺伝子を構築するために5'端に相当するDNA配列を、化学合成したフラグメント2本をアニールすること

により作成した。この合成DNA配列はアルカリ性ホスファターゼのシグナルペプチドをコードするDNA配列と融合できるようにHpaII及びClaI酵素切断によって生ずる粘着末端配列CGを5'端側に有し、成熟正常ヒト血清アルブミンA蛋白質の1番目のアミノ酸Aspから11番目のアミノ酸Pheをコードする配列を有している。このアニールさせたDNA配列にT4ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて5'端をリン酸化させたものと、pUC-HSA-EXから生じたAhaIII/SalI二重消化物とを混合し、さらにこれに大腸菌のマルチコピークローニングベクターの代表的なものの一つpAT153(Amersham社製、Twigg, A.J.及びSherratt, D. Nature 283 216-218, 1980)のClaI/SalIの二重消化物のうち大きなフラグメントと混合しこの3者をT4 DNAリガーゼにより結合させ、組換えプラスミド pAT-HSA-CXを得た。このプラスミド上で正常ヒト血清アルブミンAの1位のアミノ酸Aspから11位のアミノ酸PheをコードするDNA配列が繋がった。pAT-HSA

-CXをEcoRI/XbaIで二重消化し、正常ヒト血清アルブミンAのAsp1~Phe356をコードするDNA配列を含む小さい方のフラグメントを得た。

一方HSA-Aのカルボキシル末端側をコードするcDNAは、ヒト肝cDNAライブラリーから得たクローンλgt11(HSA-I-A)から外来cDNA配列の挿入されているEcoRIフラグメントを調製し、pUC18プラスミドのEcoRIサイトに挿入することにより組換えプラスミド pUC-HSA-1'中にクローニングした。これによりHSA-Aの358番目のアミノ酸Leuからカルボキシル末端の585番目のLeuをコードし、さらに3'側の非翻訳領域62ヌクレオチドを含むXbaI/HindIIIの二重消化物を調製した。これをpAT-HSA-CXより得たEcoRI/XbaI二重消化物及びpUC19のEcoRI/HindIII二重消化物のうち大きなフラグメントと混ぜてT4 DNAリガーゼにより連結反応を行い、成熟正常ヒト血清アルブミンAのcDNA全体を含む組換えプラスミド pUC-HSA-CHを得た。

参考例3. プレプロ配列をコードするDNAの合成及びプラスミド pUC-HSA-EIIの作製(第7図)

次の配列を有する4種類のオリゴヌクレオチド:

1. AATTCATGAAGTGGGTTACTTTTCATCTCTTTGTGTT
2. AGAACAAAGAACAACAAGAGATGAAAGTAACCCACTTCATG
3. CTGTCTCTCTCTGCTTACTCTAGAGGTGTTTTCAGACG
4. CGCGTCTGAAACACCTCTAGAGTAAGCAGAAC

を、Matteucci, M.D.及びCaruthers, M.H., Tetrahedron Letters 21, 719(1980)に記載されているホスホアミダイト法により、自動DNA合成機(Applied Biosystems モデル380B)を用いて合成した。オリゴヌクレオチド断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'-リン酸化した後、アニーリングせしめ、次にT4 DNAリガーゼにより連結して、プレプロ配列をコードする一個の二本鎖DNAを得た。

次に、正常ヒト血清アルブミンAのcDNAを含むプラスミド pUC-HSA-CH(参考例2)を制限酵素EcoRI及びClaIで二重消化して大きい方のフ

ラグメントを得、これを前記の合成DNAとT4 DNAリガーゼにより結合させプラスミド pUC-HSA-EXを作成した。

参考例4. Met(123)-Ala(151)をコードするDNAの合成(第8図)

5' 端にBamHI付着端をもち、3' 端付近にHpaII(MspI)認識配列をもち、その二本鎖部分がヒト血清アルブミンのMet(123)-Ala(151)を完全にコードする遺伝子断片の構築を以下のように行った。大腸菌での発現を効率よくするために大腸菌で高い効率で発現される遺伝子によってよく使用されるコドン(preferential codons)をできるだけ多く含むよう配列をデザインした。これらのコドンに対するtRNA種は一般に大腸菌内に多量に存在しており(たとえば、Ikemura, T. J. Mol. Biol. 151, 389-409(1981); Gouy, M. & Gautier, C. Nucleic Acids Res. 10, 7055-7074(1982))、翻訳効率に影響することが期待される。

次の4種類のオリゴヌクレオチド:

5' -GATCCATGTGCACCGCTTCCACGACAACGAAGAAACCTTC-3'

5' -AGGTATTTTTTCAGGAAGGTTTCTTCGTTGTCGTGGAAAGCGGTGCACATG-3'

5' -TGAAAAAATACCTGTACGAAATCGCTCGTCACCCGTACTTCTACGCTCCGG-3'

5' -CGAAGAACAGCAGTTCCGGAGCGGTAGAAGTACGGGTGACGACGAGCGATTTCGTAC-3'

をCaruthersら(Matteucci, M.D.及びCaruthers, M.H. Tetrahedron Letters 21, 719(1980))により開発されたホスホアミダイト法を応用した自動合成機(Applied Biosystems モデル4380B)を用いて合成した。合成されたDNA鎖(約30pmoles) 50 mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 5mMジチオスライトール及び0.2mM ATPを含有する溶液(50μl)中で6単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)存在下で37℃、60分間処理することにより5'-端をリン酸化した。

リン酸化されたフラグメント4本を混ぜ100℃の水浴中に5分間保温しついで室温で放冷してアニリングを行った。2μlのT4 DNAリガーゼ(800単位、宝酒造)を加えて16℃で一晩保温しフラグメント間を連結して二本鎖フラグメントとした。

次にこの二本鎖フラグメントをHpaII(MspI)で切断して96bpのフラグメントを得た。

参考例5. ヒト血清アルブミン断片Met(123)-Pro(303)をコードするDNA断片の作製(第8図)

正常ヒト血清アルブミンのアミノ末端側をコードする部分を欠き、さらに304番目のセリンをコードするコドンが翻訳終止コドンに変化している配列を含むλgt11ヒトcDNAクローン(HSA-IA)(参考例1:第6図)をEcoRIにより切断してヒト血清アルブミンcDNA部分を取り出し、これをプラスミドpUC19のEcoRI部位に挿入してプラスミドpUC-HSA-1を作製した。

pUC-HSA-1をPstIで切断し、生じた5' 端のリン酸基をバクテリアアルカリ性ホスファターゼで処理して除去した後、HpaII(MspI)で切断して750bpのフラグメントを切り出した。この750bpのフラグメントを実施例1において合成した96bpのフラグメントとT4 DNAリガーゼでHpaII(MspI)の付着末端同士の対合を利用して結合し

した後、pUC19のBamHIとPstIの二重消化物の大きい方のフラグメントとT4 DNAリガーゼにより連結しpSALIIプラスミドを得た。

参考例6. ポリA配列及びAATAAAシグナル配列の挿入(第9図)

ヒト血清アルブミンAのcDNAの3'側領域を含有するλgt11(HSA-IA)(参考例1、第6図)をEcoRIにより消化してヒト血清アルブミンAのcDNAを含有するDNAフラグメントを得、これをEcoRIにより切断したプラスミドpUC18に連結してプラスミドpUC-HSA-1'を得た。

参考例7. プラスミドpAT-nHSAの構築(第9図)

ブレプロヒト血清アルブミンA cDNAの5'-非翻訳領域とコーディング領域の前半部分を含むプラスミドpUC-HSA-EX(参考例2)からブレプロヒト血清アルブミンA cDNA部分をEcoRIとXbaIによる二重消化によって切り出し、ヒト血清アルブミンA cDNAのコーディング領域の後半部分と3'-非翻訳領域を含むプラスミドpUC-HSA-1'(参考例6)から切り出したXbaI-HindIII

フラグメントおよびpAT153ベクター (Amersham社製: Twigg, A. J. 及び Sheratt, D., Nature 283, 216-218, 1980) から切り出したEcoR I - Hind IIIフラグメントとを連結し、プラスミド pAT-HSA-EHを得た。アレプロヒト血清アルブミンAをコードするcDNA配列の酵母菌由来の強力なプロモーター配列と隣接させるためにcDNA配列の5'末端に付けられているEcoR I サイトとアレプロヒト血清アルブミンAのシグナルペプチドをコードする配列中三番目のアミノ酸T r p から5番目のアミノ酸T h r のコドンにわたって存在するBstE II サイトを利用した。アレプロヒト血清アルブミンAの5'-非翻訳領域とシグナルペプチドのアミノ末端から3個のアミノ酸をコードする配列とを含むEcoR I - BstE II フラグメントをpAT-HSA-EHから切除した。残った大きなDNAフラグメントを5'末端にEcoR I 粘着末端配列を、3'末端にBstE II 粘着末端配列を有し、アレプロヒト血清アルブミンAのシグナルペプチドの三番目のアミノ酸までをコードすることのできる合成DNAフラグメン

ト:

EcoR I BstE II
5' - AATTCATGAAGTGG
 GTACTTCACCCATTG - 5'

と連結した。すなわち、この合成フラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理することにより5'-末端をリン酸化し、T4 DNAリガーゼによりこの連結を行い、天然型のアレプロヒト血清アルブミンA cDNAを含むプラスミド pAT-nHSAを作製した。

参考例8. プラスミド pAT-nHSA-Aの作製(第1図)

pAT-nHSA(参考例7)をアレプロヒト血清アルブミンA cDNA配列の5'端にあるEcoR I サイトで切断し、ここに両末端がEcoR I 粘着末端配列で内部にXho I サイトを含む合成リンカー

EcoR I Xho I EcoR I
5' - AATTCTCGAG
 GAGCTCTTAA - 5'

を挿入しプラスミド pAT-X-nHSAを作製した。

このpAT-X-nHSA中のアレプロヒト血清アルブミンA cDNA配列の3'末端に隣接するpAT153プラスミド由来のHind III - BamH I フラグメントを切り出し、pUC-HSA-1'より切り出したアレプロヒト血清アルブミンA cDNAの3'側配列でポリAシグナル及びポリA配列を含む領域とpUC18ベクター由来の領域とを含むHind III - BamH I フラグメントと置換しプラスミド pAT-nHSA-Aを作製した。

4. 図面の簡単な説明

第1-1~1-2図はミニHSA発現プラスミドpJDB-ADH-nHSAの作製過程を示す。

第2-1~2-3図は短縮HSA発現プラスミドpJDB-ADH-lHSAの作製過程を示す。

第3図はプラスミドpUC-nHSAの作製過程を示す。

第4図は、AH22(pJDB-ADH-nHSA)(レーン3)及びAH22(pJDB-ADH-lHSA)(レーン5)からの発現生成物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図であり、クマシーブリリアントブルーに

より蛋白質バンドを染色してある。レーン1は精製ヒト血清由来ヒト血清アルブミン、レーン2及び6は分子量標準であり、ホスホリラーゼB(分子量94,000)、ウシ血清アルブミン(分子量67,000)、オバルブミン(分子量43,000)、炭酸脱水素酵素(分子量30,000)、大豆トリプシンインヒビター(分子量20,000)及びラクトアルブミン(分子量14,400)でありレーン4はHSAフラグメント発現プラスミドを含まない宿主AH22株培養液中の蛋白質の電気泳動図である。

第5図は、AH22(pJDB-ADH-lHSA)の培養上清(レーン2)及び細胞内蛋白質(レーン5)、AH22(pJDB-ADH-nHSA)の培養上清(レーン3)及び細胞内蛋白質(レーン6)、AH22の培養上清(レーン1)及び細胞内蛋白質(レーン7)、それに精製ヒト血清由来ヒト血清アルブミン(レーン4)のウェスタンブロット図であり、抗ヒト血清アルブミン抗体と反応した蛋白質を示す。

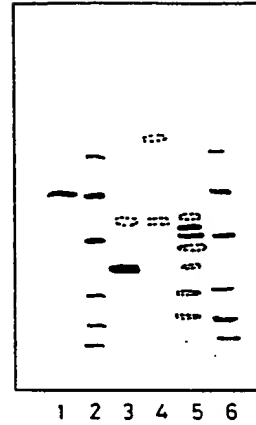
第6図はヒト血清アルブミンをコードするcDNAの制限酵素地図を示す。

第7図はプラスミド pUC-HSA-EH の作製過程を示す。

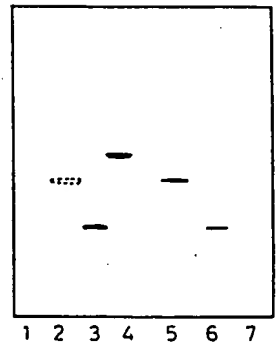
第8図はプラスミド pSAL II の作製過程を示す。

第9図はプラスミド pAT-nHSA の作製過程を示す。

第10図はプラスミド pAP-nHSA-A の作製過程を示す。



第4図



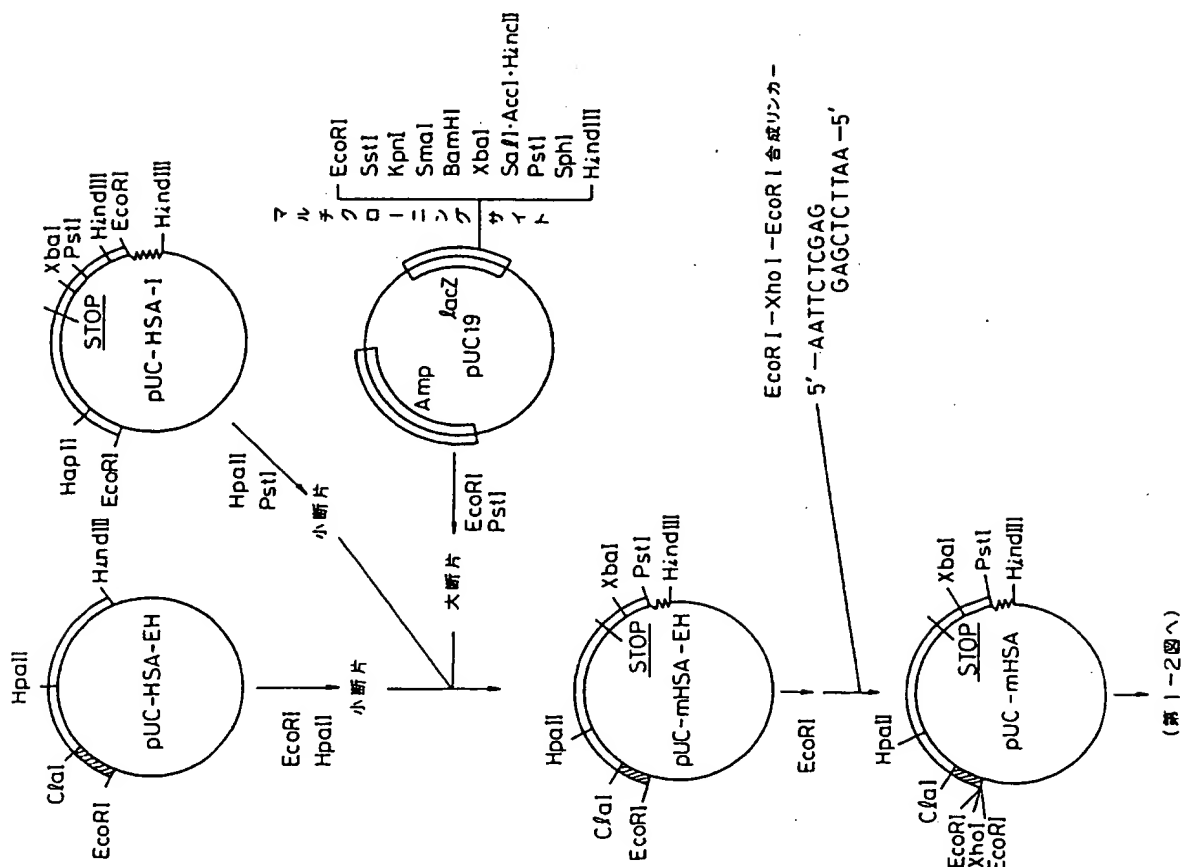
第5図

特許出願人

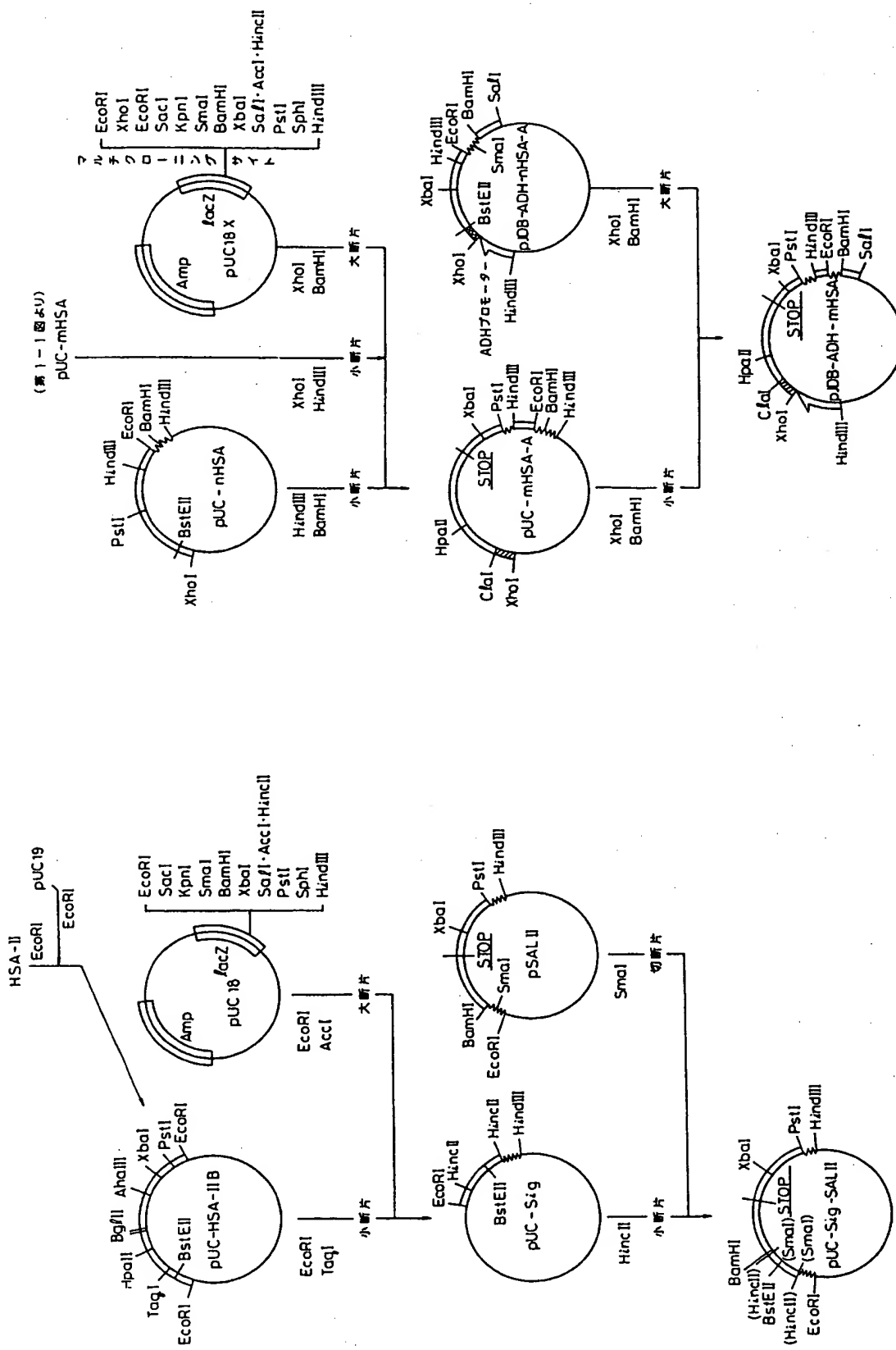
東燃株式会社

特許出願代理人

弁理士	青木	朗
弁理士	石田	敬
弁理士	福本	積
弁理士	山口	昭之
弁理士	西山	雅也

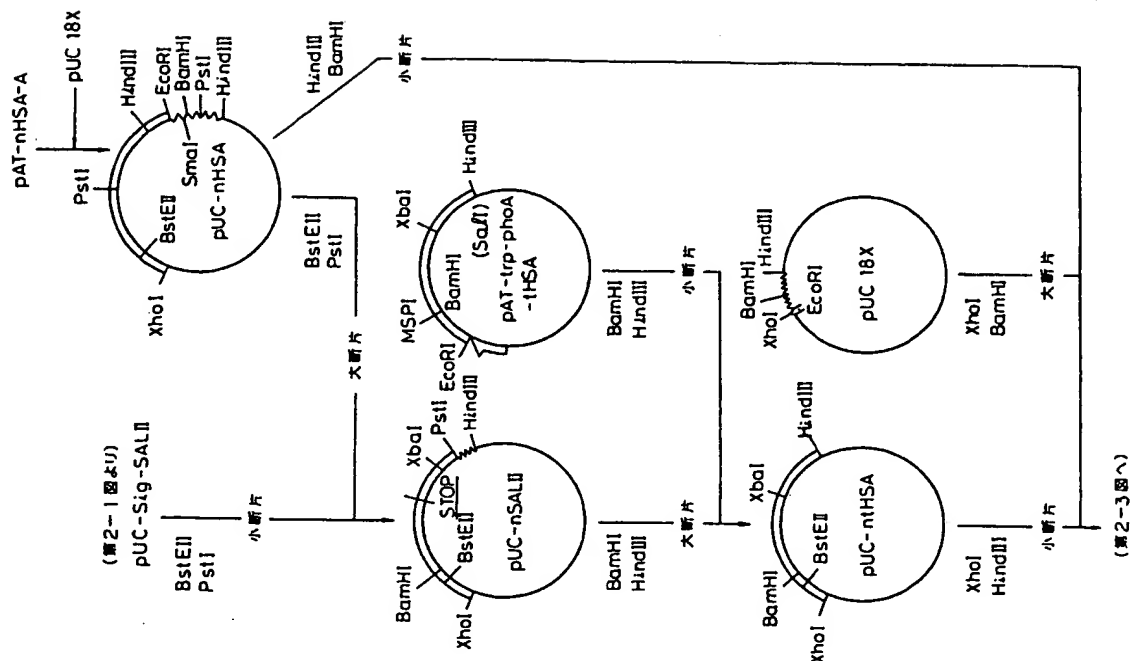


第1-1図

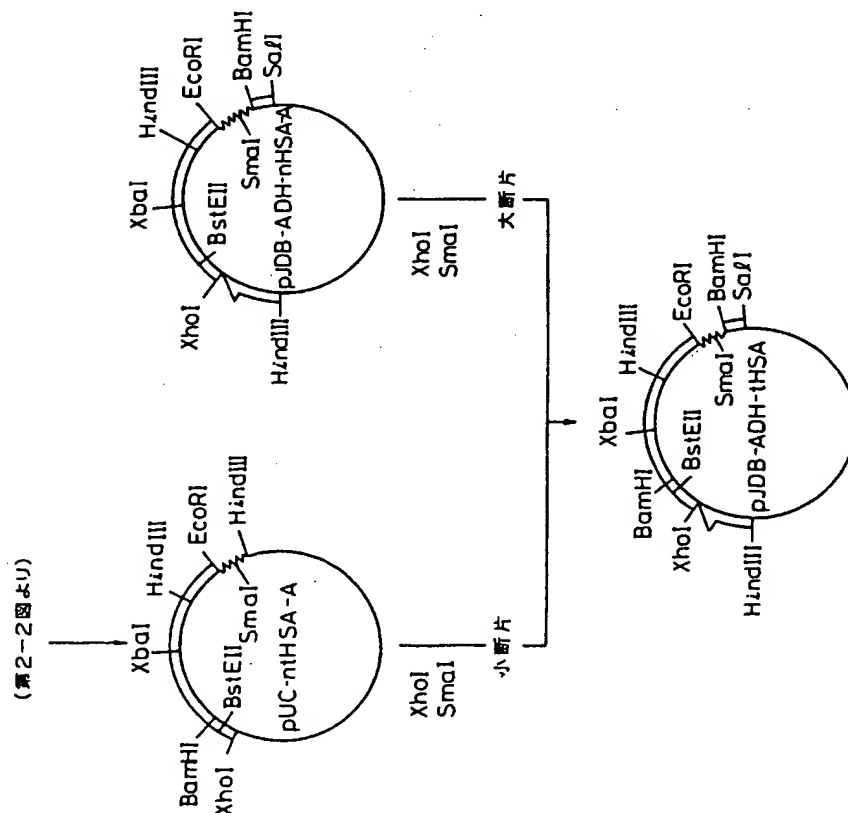


第1-2図

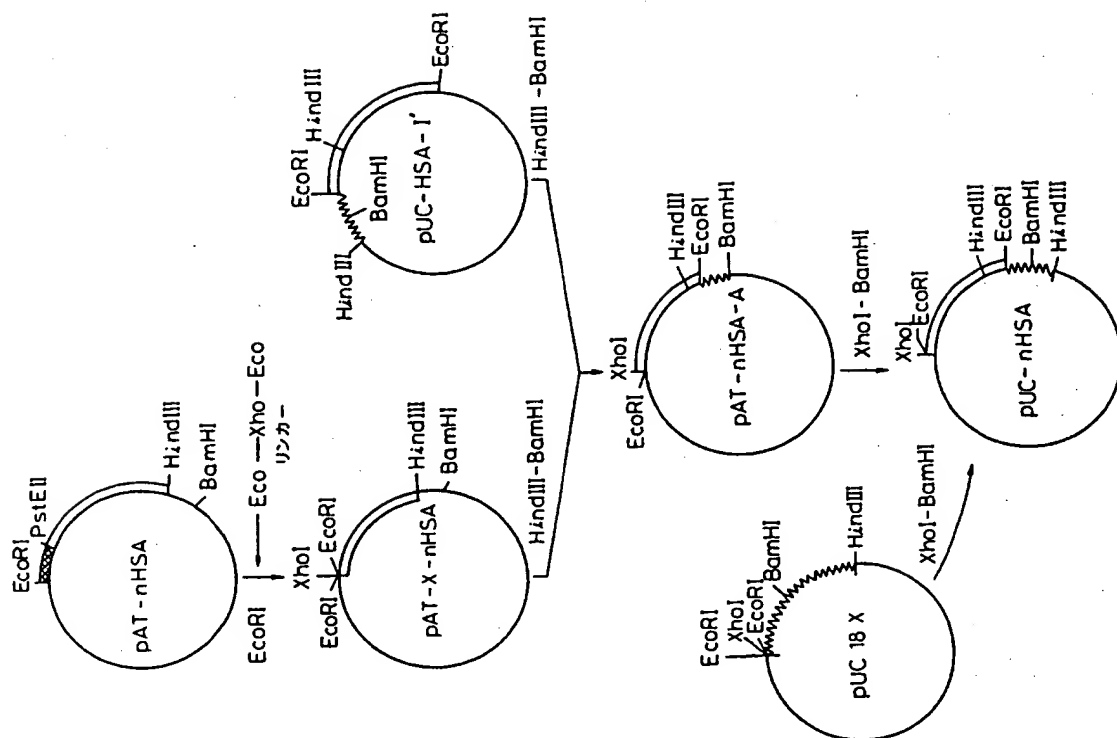
第2-1図



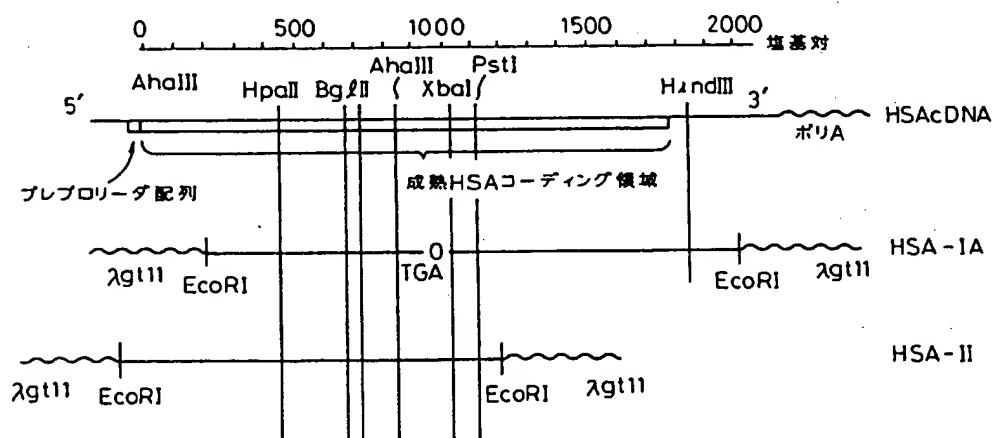
第2-2図



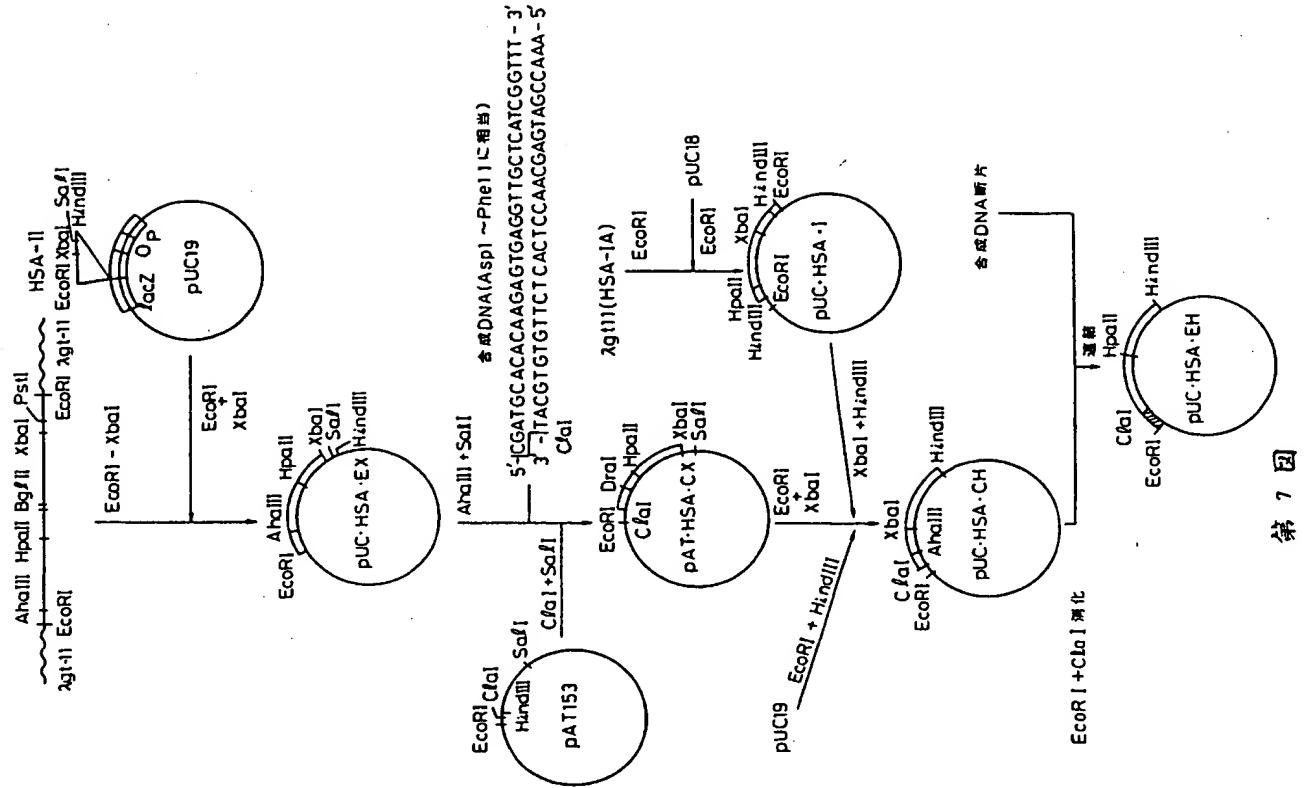
第2-3図



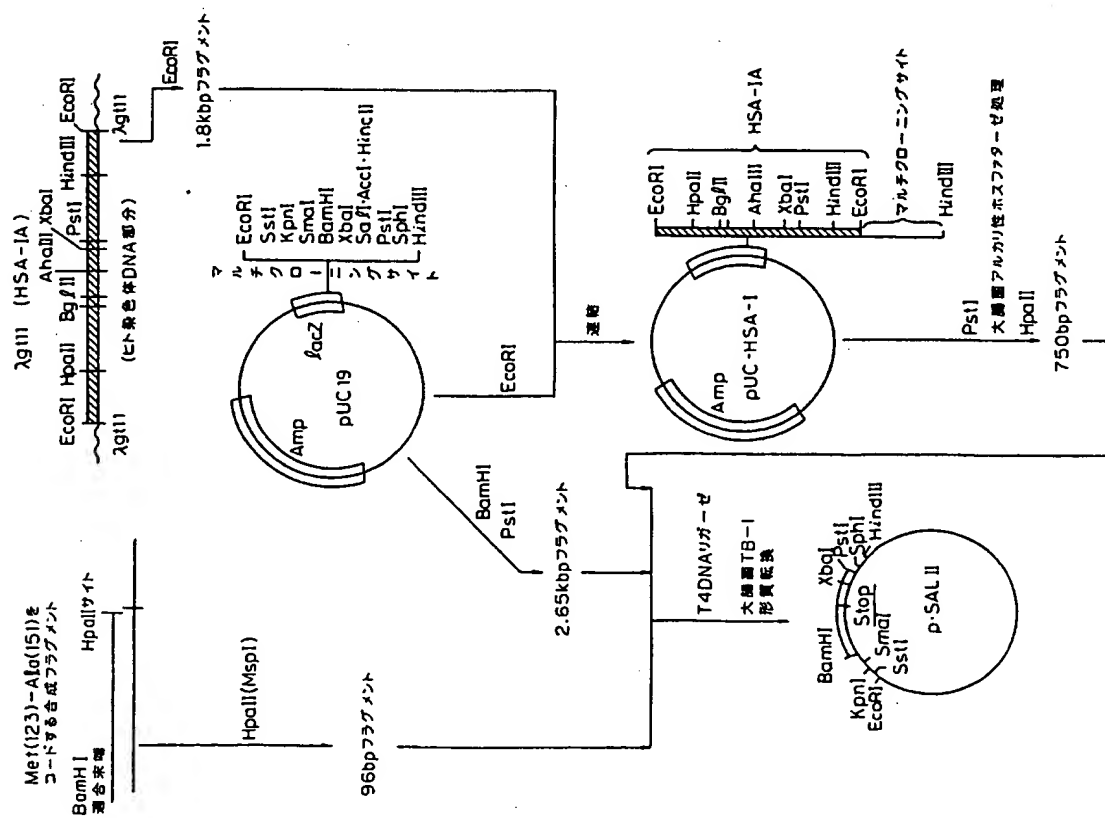
第 3 図



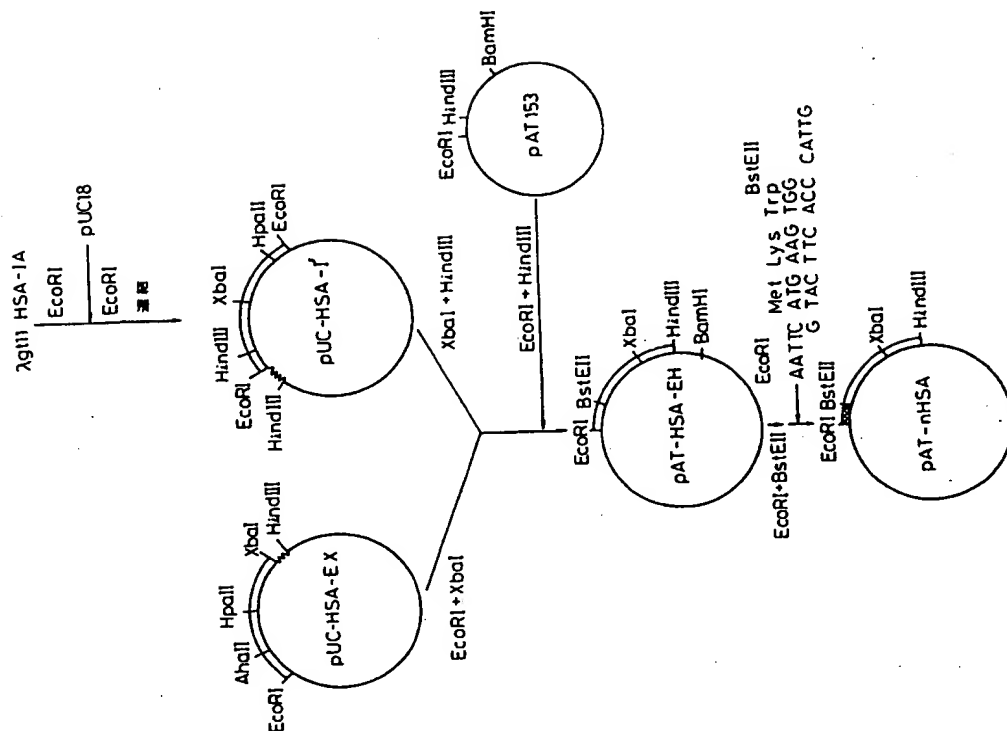
第 6 図



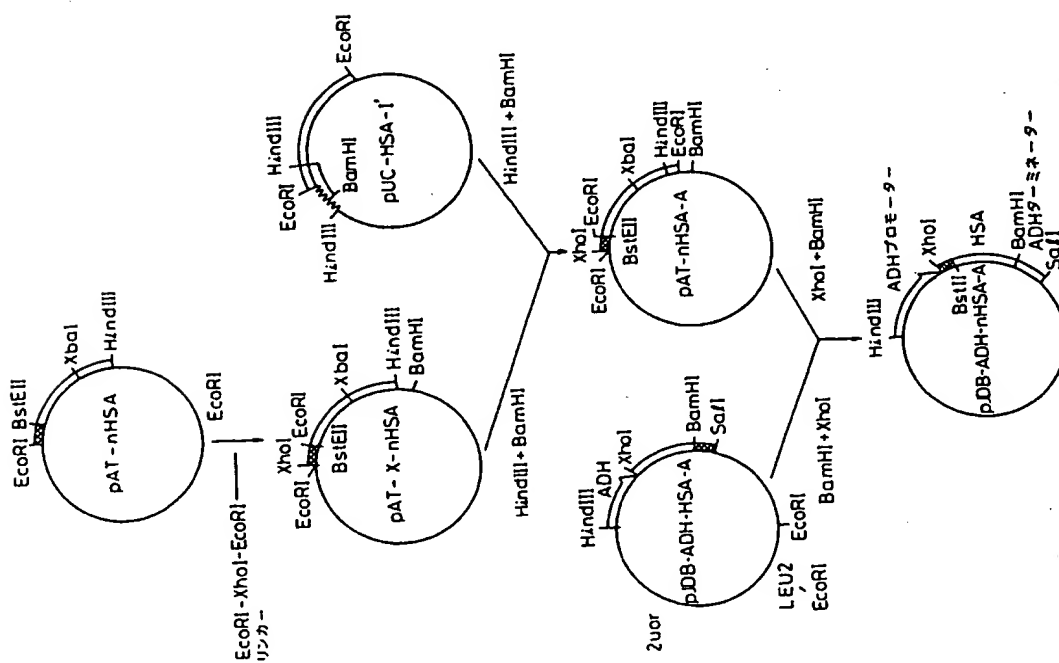
第 7 図



第 8 図



第 9 圖



第10圖

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

C 07 K 15/16

8619-4H

C 12 N 1/19

9050-4B

15/62

C 12 P 21/02

ZNA C

8214-4B

//(C 12 N 1/19

C 12 R 1:865)

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:865)